

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Matijević

TOKSIČNI UČINAK ŽELJEZA NA ZELENU I SMEĐU HIDRU
(*Hydra viridissima* I *Hydra oligactis* Pallas)

Diplomski rad

Zagreb, 2011.

Ovaj rad izrađen u Zoologijskom zavodu (Evolucija) Biološkog odjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Gorana Kovačevića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja prof. biologije i kemije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

TOKSIČNI UČINAK ŽELJEZA NA ZELENU I SMEĐU HIDRU (*Hydra viridissima* I *Hydra oligactis* Pallas)

ANA MATIJEVIĆ
Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK: Željezo je jedan od najraširenijih metala u Zemljinoj kori. Hidra je slatkovodna životinja koljena Cnidaria. Toksični učinak željeza na različite organizme bio je već predmet istraživanja, ali ovo je prvo dokumentirano istraživanje o njegovu učinku na hidre. Zelena hidra sadrži u svojim gastrodermalnim mioepitelnim stanicama simbiotsku algu. Jedinke simbiotske zelene hidre bile su tretirane sa šest koncentracija vodene otopine željeznog dekstrana, dok je nesimbiotska smeđa hidra bila tretirana s 14 koncentracija vodene otopine željeznog dekstrana tijekom tri dana. Morfološke promjene su praćene pomoću stereolupe i to migracija jedinki u eksperimentalnoj posudici, promjena oblika tijela, reakcija na mehanički podražaj, odsutnost lovki, lučenje sluzi i nesporno razmnožavanje. Migracija hidri je prvi način izbjegavanja štetnog učinka (mikro)okoliša, nakon čega je uslijedila promjena oblika tijela. Histološke promjene praćene su pomoću svjetlosnog mikroskopa. Morfometrijska istraživanja obuhvaćala su mjerenja površina ektoderma i gastroderma te debljine mezogleje. Depozicije željeza u tkivu hidri su bile vidljive su kao plavo obojenje unutar stanica. Visoke koncentracije željeza uzrokovale su morfološke i histološke promjene i letalni učinak. Zelena hidra je pokazala veću otpornost u preživljavanju od smeđe. Simbioza se pokazala kao evolucijska prednost.

(35 stranica, 11 slika, 7 tablica, 52 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: hidra, željezni dekstran, toksičnost, simbioza, migracija, morfološke i histološke promjene, morfometrija

Voditelj: Doc.dr.sc. Goran Kovačević,

Ocjenitelji: Doc.dr.sc. Goran Kovačević
Prof.dr sc. Zdravko Dolenc
Doc.dr.sc. Vesna Petrović Peroković
Prof.dr.sc. Davor Kovačević

Rad prihvaćen: 09. ožujka 2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

TOXIC EFFECT OF IRON ON GREEN AND BROWN HYDRA *(Hydra viridissima and Hydra oligactis Pallas)*

ANA MATIJEVIĆ
Rooseveltova trg 6, Zagreb

SUMMARY: Iron is among the most common metals in Earth's crust. Hydra is a freshwater animal that belongs to the phylum Cnidaria. Toxic effect of iron on various organisms has been investigated before but this is the first documented research on its effect on hydras. Green hydra contains symbiotic algae in its gastrodermal myoepithelial cells. Individuals of symbiotic green hydra were treated with six concentrations of aqueous solution of iron dextran, while aposymbiotic brown hydra was treated with 14 concentrations of aqueous solution of iron dextran for three days. Morphological changes migration of individuals in experimental dish, changes of body shape, reaction to mechanical stimuli, tentacle reduction, mucous secretion and asexual reproduction were monitored with stereoloupe. Migration of hydras was the first step in evading deleterious microenvironmental conditions, followed by changing its body shape. Histological changes were observed with light microscope. Morphometric analysis included measuring of endoderm and gastroderm surface areas and mesoglea thickness. Iron depositions in hydra tissue were observed as blue staining within cells. High concentrations of iron caused morphological and histological changes and mortality. Green hydra showed a higher level of resistance in surviving than brown hydra. Symbiosis was pointed out as an evolutionary advantage.

(35 pages, 11 figures, 7 tables, 54 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Keywords: hydra, iron dextran, toxicity, symbiosis, migration, morphological and histological changes, morphometry

Supervisor: Dr. Goran Kovačević, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Goran Kovačević, Asst. Prof.
Dr. Zdravko Dolenec, Prof.
Dr. Vesna Petrović Peroković, Asst. Prof.
Dr. Davor Kovačević, Prof.

Thesis accepted: March 9th, 2011.

ZAHVALA

Zahvaljujem prof. dr. sc. Mirjani Kalafatić na pruženoj prilici za izradu ovog diplomskog rada iz kolegija Evolucija za koji me potaknula svojim stručnim i zanimljivim predavanjima.

Hvala tehničarki Nadici Vincek za pomoć prilikom izrade preparata kao i ostalim djelatnicima zavoda koji su uvijek bili ljubazni i susretljivi.

Veliko hvala suvoditeljici mog diplomskog rada, dr. sc. Gordani Gregorović, koja je svojim korisnim savjetima i sugestijama upotpunila pisanje ovog rada.

Najveće hvala mom mentoru doc. dr. sc. Goranu Kovačeviću na njegovom strpljenju, stručnim i korisnim uputama i svakom poticajnom trenutku i savjetu prilikom izrade tehničkog dijela i pisanja ovog diplomskog.

Hvala roditeljima i baki Marici na svojoj podršci tijekom mog školovanja.

Najveće hvala voljenoj osobi na strpljenju, pažnji i ljubavi.

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. Hidra	1
1.2. Histološka i citološka građa hidre	2
1.3. Zelena hidra <i>Hydra viridissima</i> Pallas i smeđa hidra <i>Hydra oligactis</i> Pallas	4
1.4. Željezo	5
1.5. Toksičnost željeza	6
1.6. Morfometrija	8
1.7. Cilj istraživanja	8

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijal	9
2.2. Metode	9
2.3. Morfološke promjene	9
2.4. Histokemijsko dokazivanje željeza	9

3. REZULTATI

3.1. Morfološke promjene zelene i smeđe hidre tretirane s Fe	11
3.1.1. Kontrolni uzorak zelene hidre i zelene hidre tretirane s 1 mg/L Fe	11
3.1.2. Zelene hidre tretirane s 400 mg/L Fe	11
3.1.3. Zelene hidre tretirane s 1400 mg/L, 1500 mg/L, 1600 mg/L i 4000 mg/L Fe	11
3.1.4. Kontrolni uzorak smeđe hidre i smeđe hidre tretirane s 0,5 mg/L, 1 mg/L, 4 mg/L, 10 mg/L i 20 mg/L Fe	13
3.1.5. Smeđe hidre tretirane s 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, 700 mg/L i 1000 mg/L Fe	14
3.1.6. Smeđe hidre tretirane s 1400 mg/L, 1500 mg/L, 1600 mg/L i 4000 mg/L Fe	15
3.2. Histološke promjene zelene i smeđe hidre tretirane s Fe	18
3.2.1. Kontrolni uzorak zelene i smeđe hidre	18
3.2.2. Zelena i smeđa hidra tretirane s 1 mg/L Fe	19

3.3.3. Zelena i smeđa hidra tretirane s 400 mg/L Fe	20
3.3.4. Zelena i smeđa hidra tretirane s 1400 mg/L Fe	20
3.3.5. Zelena i smeđa hidra tretirane s 1500 mg/L Fe	25
4. RASPRAVA	26
5. ZAKLJUČAK	30
6. LITERATURA	31

1. UVOD

1.1. Hidra

Hidra je slatkovodni beskralježnjak rasprostranjen po cijelom svijetu. Pripada koljenu Cnidaria-žarnjaci, razredu Hydrozoa obrubnjaci, redu Hydrioda, porodici Hydridae. Osim hidra, u žarnjake spadaju meduze i koralji. Meduze i koralji su rasprostranjeni u moru i slatkim vodama dok su hidre isključivo slatkovodne. Ime Hydra potječe iz antičkih mitova. Tako se zvala neman kojoj bi iz svake odsječene glave narasle dvije nove glave (ZAMAROVSKY, 1985). Regenerativne sposobnosti hidre su izuzetne (KALAFATIĆ I SUR., 2001) te je hidra klasičan modelni organizam za razumijevanje fundamentalnih razvojnih procesa (SIEBERT I SUR., 2007). Tijelo hidre je cilindričnog oblika. Na apikalnom kraju se nalazi hipostom s lovkama, u sredini je gastralna regija s pupnom regijom i na bazalnom kraju sa nalazi stopalo (SLIKA 1).



Slika 1. Hidra (preuzeto s interneta: www.adrianoejean.blogspot.com)

Žarnjaci su dobili ime po žarnicama ili nematocistama, jednim od najkompleksnije građenim staničnim organelima u životinjskom svijetu koji se nalaze u žarnim stanicama ili nematocitama. U tijelu hidre žarne stanice najgušće su rasprostranjene u lovkama i u području hipostoma. Uloga im je hvatanje plijena ili obrana. Sadrže neurotoksine kojima omamljuju žrtvu kao i bodežiće kojima žrtvu probadaju te je pomoću niti privuku hipostomu gdje se nalaze usta i progutaju. Na usta se nastavlja gastralna šupljina koja služi za ekstracelularnu probavu hrane pomoću zimogenih stanica koje luče probavne enzime u gastralnu šupljinu. Hrana se probavlja i intracelularno. Difuzijom hrana dopijeva u sve dijelove tijela hidre, dok kontrakcijama cijelog tijela izbacuje neprobavljene tvari kroz hipostom. Hidre se hrane bakterijama, algama, malim račićima i ličinkama kukaca koje lovkama prinose usnom otvoru.

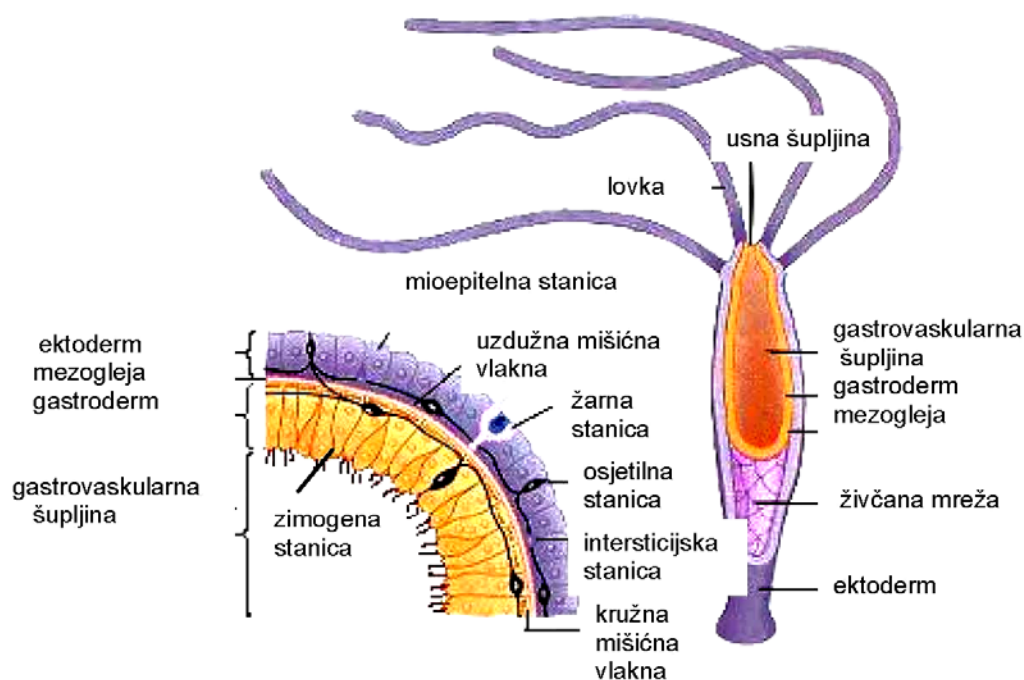
Difuzija se također koristi i za izmjenu plinova odnosno disanje životinje. Obitavalište hidri je dno, vodeno bilje i kamenje za koje su pričvršćene i uglavnom su sedentarni organizmi. Plutaju pomoću plinskog mjehura kojeg stvara bazalna ploča stopala. Ona drži hidru pričvršćenu za dno ili površinu biljke vodi. Kretanje hidri omogućuju kontrakcije cijelog tijela kao i lovke. Čimbenici okoliša su glavni uzrok pokretanja i migracije hidri.

Hidre se razmnožavaju spolno i nespolno (MATONIČKIN, 1978). Nespolno razmnožavanje ili pupanje odvija se u gastralnom dijelu koji obuhvaća pupnu regiju. Spolno razmnožavanje hidri je rjeđe i tada se formiraju muške i ženske gonade. Formiranje gonada stimuliraju čimbenici okoliša, poput temperature, pH medija, koncentracije O_2 , CO_2 te gladovanja (BURNETT, 1973; KUZNETSOV I SUR., 2001).

Kod žarnjaka prvi puta nalazimo živčani sustav. To je jedan od najprimitivnijih živčanih sustava budući da su živčane stanice raspoređene jednako po čitavom tijelu i provode živčane impulse u svim smjerovima (BURNETT, 1973). Rezultat podražaja hidre je reakcija čitavog tijela, odnosno kontrahiranje tijela i lovki te višestruko smanjenje njihove duljine.

1.2. Histološka i citološka građa hidre

Tijelo hidre je troslojno, izgrađeno od ektoderma, mezogleje i gastroderma (SLIKA 2). Vanjski stanični sloj se naziva ektoderm, a građen je od mioepitelnih, intersticijskih i živčanih stanica, knidoblasta i knida. Osnovne stanice ektoderma su mioepitelne stanice koje sežu od površine ektoderma do mezogleje. Njihov apikalni dio je sekrecijski aktivan i proizvodi mukozni omotač koji štiti hidru od mehaničkih oštećenja i gubitka vode i soli iz tijela. Sekrecijska aktivnost je najveća u području stopala jer je tim dijelom tijela hidra pričvršćena za podlogu.



Slika 2. Prikaz citološko histološke građe hidre (preuzeto sa interneta www.tutorvista.com)

Stanice između mioepitelnih stanica su intersticijske stanice koje tijekom embriogeneze nisu diferencirane, već su rezervne stanice kod kojih je pojačana mitotička aktivnost i imaju sposobnost diferenciranja u druge ektodermalne stanice.

Žarnice stanice knidocite ili nematocite su stanice koje sadrže knidociste odnosno knide ili nematociste. Žarne i žljezdane stanice javljaju se usporedno s pojavom žarnjaka (HWANG I SUR., 2007). Nematocite nastaju iz nematoblasta i podijeljene su prema funkciji u četiri skupine: penetrante, koje poput harpuna probadaju plijen, glutinante, koje svojom ljepljivošću hvataju plijen, volvente, koji su nalik užetu za hvatanje i ptihociste, koje nalazimo u zadružnim vrstama. Baterije su nakupine knida koje reagiraju na mehanički i kemijski podražaj. Živčane stanice su motorne, osjetne i neurosekretorne. Na hipostomu je opisan živčani prsten koji je sličan središnjem živčanom sustavu razvijenijih životinja te je statičan i stabilan u usporedbi s mrežastim živčanim sustavom (KOIZUMI, 2002).

Mezogleja nije građena od stanica i nalazi se između staničnih slojeva ektoderma i gastroderma. Želatinozne je građe i sadrži kolagen, lipide, proteine i ugljikohidrate. Mezogleja omogućuje prolaz hrane kao i migraciju stanica tijekom regeneracije (ŽNIDARIĆ, 1970). Nastanku mezogleje doprinose i ektoderm i gastroderm (ZHANG I SUR., 2005). Voda je sastavni dio mezogleje i to u velikoj količini tako da mezogleja služi i kao potporanj hidri.

Gastrovaskularnu šupljinu oblaže gastroderm koji se sastoji od gastrodermalnih mioepitelnih stanica i zimogenih stanica. Bazalna membrana gastrodermalnih mioepitelnih stanica je pričvršćena za mezogleju. U tom dijelu koji graniči s mezoglejom nalaze se kružno postavljena mišićna vlakna čijom se relaksacijom i kontrakcijom hidra opušta ili steže. Membrane apikalnog dijela stanica čine mikrovile koji kontrakcijom povećavaju površinu apsorpcije hrane. Zimogene stanice koje su vrčastog oblika nalaze se tanjim dijelom stanice vezane za mezogleju, a širi im strši u gastrovaskularnu šupljinu. Sadrže granule ispunjene hidrolitičkim enzimima koje omogućuju ekstracelularnu probavu (BURNETT, 1973). Sudjeluju u regeneraciji hidre tako da se dediferenciraju u gastrodermalne intersticijske stanice koje se dalje dijele i diferenciraju u druge tipove stanica (ŽNIDARIĆ, 1971).

1.3. Zelena hidra *Hydra viridissima* Pallas i smeđa hidra *Hydra oligactis* Pallas

Zelena hidra (*Hydra viridissima* Pallas) i smeđa hidra (*Hydra oligactis* Pallas) morfološki i histološki anatomski imaju jednak plan građe, međutim, promatrajući ih odmah se primjećuje različita boja čitavog tijela. Zelena boja zelene hidre potječe od jednostaničnih algi roda *Chlorella* koje su smještene u gastrodermalnim mioepitelnim stanicama hidre. U jednoj stanici nalazi se do 20 zelenih algi (DUNN, 1987; HOLSTEIN I EMSCHERMANN, 1995). Svaka alga nalazi se unutar jedne vakuolarne membrane (O' BRIEN, 1982; REISSER I WIESSNER, 1984).

Zelena hidra i alga su u uzajamnom odnosu kojeg nazivamo simbioza. Simbioza (grč. *syn* s, sa, *bíos* život) je dugotrajan tijesan suživot dviju ili više vrsta organizama koji pripadaju različito nazvanim kategorijama i žive u uskom odnosu većinu svog života. Smatra se da su upravo simbiotski procesi imali važnu ulogu u postanku raznolikosti živog svijeta i evoluciji višestaničnosti (MARGULIS I SAGAN, 2002). Hidra se koristi produktima fotosinteze koje proizvodi alga, dok alga od hidre dobiva dušikove i sumporove spojeve. Smeđa hidra ne tvori simbiotske odnose za razliku od zelene hidre koja ima veliku adaptivnu vrijednost (BURNETT, 1973). Smatra se da su preadaptacije hidre i alge odgovorne zašto određene vrste uspostavljaju, a druge ne simbiotske odnose.

1.4. Željezo

Željezo je kemijski element koji u periodnom sustavu elemenata nosi simbol Fe. Simbol elementa dolazi od latinskog naziva za željezo - *ferrum*. Željezo je poznato od davnih vremena (~ 2500. godine prije Krista). Na Zemlji je najrasprostranjeniji metal, a nalazimo ga i na Mjesecu i Suncu, te je iz svemira meteoritima stizao na Zemlju. Za žive organizme je esencijalni element i život je bez njega nemoguć. Tvrd je i sjajno srebrne boje. U Zemljinoj kori je četvrti element po zastupljenosti, s 4,7 %, iza kisika, silicija i aluminija. Ima devet izotopa i tri kristalne forme. U industriji je najiskorišteniji od svih metala radi svojih fizičkih svojstava. Dobiva se uglavnom iz svojih oksidnih, a rjeđe karbonatnih ruda (SLIKA 3). Glavne rude željeza su magnetit (Fe_3O_4), hematit (Fe_2O_3), limonit (FeOOH) i siderit (FeCO_3). Industrijski, željezo se dobiva redukcijom oksida željeza koksom. Brzo korodira, naročito u vlažnom zraku i pri povišenoj temperaturi tako da se stvara crveno smeđi sloj zvan hrđa. U neoksidirajućim kiselinama se otapa.



Slika 3. Željezna ruda (preuzeto sa interneta www.gradimo.hr)

Željezo u svemiru nastaje procesom nuklearne fuzije pred kraj života zvijezde. Nuklearna fuzija je proces spajanja lakših atomskih jezgri pri čemu nastaje teža jezgra. Upravo je željezo zadnji element koji nastaje prije eksplozije zvijezde poznate kao supernova. Tada se oslobađa energija za nastanak ostalih elemenata koji su danas poznati na Zemlji, a teži su od željeza. Zemljina jezgra se sastoji od željeza i nikla.

Tijekom evolucije željezo je odigralo važnu ulogu zadržavanjem velikih količina kisika u svojim netopivim oksidima taložeći ih na dnu pradavnih oceana sve dok se nisu stvorili uvjeti

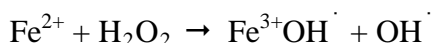
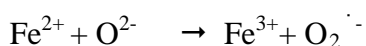
za korištenje kisika procesom fotosinteze. Može se reći da je željezo jedan od ključnih čimbenika u očuvanju života od najranije prošlosti. U živom svijetu željezo je neizostavni dio enzima i enzimskih kompleksa. Već kod kolutičavaca nalazimo željezo kao prenosioca kisika, što se golim okom očituje kao crvena boja krvne plazme.

Pomanjkanje željeza kod čovjeka može dovesti do ozbiljnih poremećaja zvanih anemija, a koje mogu ukazivati na prisustvo vrlo teških bolesti koje onemogućuju normalnu apsorpciju željeza u tankom crijevu. Ljudi željezo unose putem hrane ili ukoliko je to potrebno putem medikamenata. Naročito veliku potrebu za željezom imaju trudnice i to od 2,5 do 5,0 mg dnevno, žene koje imaju menstrualni ciklus oko 2,0 mg dnevno te novorođenčad i djeca u pubertetu. Željezo je sastavni dio proteina prenosioca kisika, hemoglobina i mioglobina, a od ukupne količine željeza u tijelu ljudi od 60 % do 70 % je u sastavu hemoglobina (ANDREWS, 2002). Osim hemoglobina, željezo je sastojak mnogih enzima koji sudjeluju u biokemijskim procesima.

1.5. Toksičnost željeza

Iako je željezo esencijalni metal, ono može biti i toksično ukoliko se u organima i tkivima akumulira u prekomjernim količinama jer izaziva oksidativni stres. Oksidativni stres je stanje prekomjernog stvaranja slobodnih radikala koji dovode do oštećenja stanica (POLI I PAROLA, 1997). Slobodni radikali su molekule koje imaju nesparene elektrone u vanjskoj ljusci i stoga izrazitu reaktivnost. Oksidacijskim ili redukcijskim procesima slobodni radikali reagiraju s DNA, staničnim proteinima ili lipidima (McCORD, 2000) i izazivaju njihovo oštećenje. Biokemijski najznačajniji su superoksidni radikal $O_2^{\cdot -}$ i hidroksilni radikal OH^{\cdot} . Oni spadaju u reaktivne oblike kisika. Također postoje i reaktivni oblici dušika koji su također vrlo reaktivni kao slobodni radikali.

Primjeri nastanka nekih slobodnih radikala:



Biomembrane u svom sastavu sadrže nezasićene masne kiseline koje su osjetljive na oštećenja izazvana slobodnim radikalima (CARLSEN I SUR., 2005) jer potiču reakcije

lipidne peroksidacije. Reakcije lipidne peroksidacije dovode do narušavanja strukture, biofizičkih značajki i konformacije masnih kiselina u sastavu staničnih membrana, a time i samih membrana. Posljedica toga je gubitak fluidnost membrane, opadanje vrijednost membranskog potencijala, stanica može početi otpuštati svoj sadržaj, a na kraju može doći i do smrti stanice (BACON I BRITTON, 1990; HALLIWELL I GUTTERIDGE, 1990).

Željezo osim svojih pozitivnih svojstava može djelovati i kao veliki onečištač. Akvatički ekosustavi su danas onečišćeni ljudskim djelovanjem, ali teški metali se i prirodno nalaze u tim ekosustavima (MARTIN I COUGHTREY, 1982). U tragovima su od životne važnosti, dok njihova povećana koncentracija predstavlja toksični učinak za sve žive organizme. Cijevi od željeza mogu uzrokovati otapanje željeza u vodi što je vrlo nepoželjno jer je dozvoljena koncentracija željeza u pitkoj vodi 300 µg/L (Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće, Narodne novine br. 46/94). Koncentracija željeza u rijekama iznosi oko 0,7 mg/L, a u podzemnim vodama od 0,5 do 10 mg/L, ali mogu biti i veće od 50 mg/L. Vrsta tla i njegove prirodne karakteristike su glavni čimbenik o kojem ovisi koncentracija željeza u vodama. Maksimalna dopuštena koncentracija željeza u kopnenim vodama iznosi 1g/L (Uredba o opasnim tvarima u vodama, Narodne novine br.78/98).

Željezo nalazimo i u zraku i njegova koncentracija ovisi o naseljenosti područja. Nenaseljena područja imaju koncentraciju željeza od 50 do 90 ng/m³, a naseljena oko 1,6 µg/m³. Štetnost željeza je da njegovim kroničnim udisanjem dolazi do izazivanja željezne pneumokonioze (GURZAU I SUR., 2003).

Otpad je također izvor željeza i u svježem otpadu ga ima 40 g/kg dok ga u starijem otpadu ima od 44 do 48 g/kg. Razgradnja otpada koji sadrži željezo i njegovo otpuštanje u prirodi ovisi o temperaturi, vlazi, alkalinitetu, pH. U tlu se željezo nalazi kao dvovalentno i trovalentno, u biljkama je uglavnom u trovalentnom stanju. Potječe iz primarnih i sekundarnih minerala i u kiselim tlima se vrlo lako otapa. Primarni minerali nastaju kristalizacijom magme. Sekundarni minerali nastaju raspadom primarnih i njihovom ponovnom kristalizacijom. Rezerve željeza u tlu su pretežito anorganske prirode, a ukupni sadržaj je između 0,5 i 4,0 %. Kasnije studije u kojima je razina redukcije trovalentnog željeza u sedimentu mjerena direktno, pokazale su da je dodavanje humusnih supstanci poroiznim stijenama siromašnim organskim materijalom uvelike stimuliralo redukciju trovalentnog željeza (NEVIN I LOVLEY, 2000).

1.6. Morfometrija

Morfometrija se u posljednjih petnaest godina koristi kao značajna metoda istraživanja u raznim biološkim istraživanjima (GRIBBEN I SUR., 2001; NAKAHARA I SUR., 2003). Ovom metodom moguće je mjeriti površinu stanica, njihovu širinu, dužinu, volumen i ostale stanične parametre. Mjerenjem dvodimenzionalnih presjeka dobivaju se i informacije o trodimenzionalnoj strukturi mjerenih uzoraka. Citološka morfometrijska analiza prvi put je upotrijebljena 1993. godine. Izmjereni su acinusi stanica urealne žlijezde normalnih kastriranih i testosteronom tretiranih kastriranih miševa i to veličina jezgara, mitohondrija i citoplazme (PARR I SUR., 1993). Od tada se koristi i u medicini kao jedna od dijagnostičkih metoda pri dijagnosticiranju različitih patoloških stanja.

U biologiji se različiti test organizmi, beskrležnjaci i kralježnjaci, koriste za istraživanja i na njima se provode morfometrijska istraživanja. Morfometrijom je razjašnjen taksonomski status biljaka *Teucrium euganeum* Vis., *Teucrium siculum* (Rafin) Guss. i *Teucrium scordonia* (TORNADORE I SUR., 2004). Morfometrijski su obrađene i površine plavih depozicija koje obilježavaju akumulirano željezo u jetri šarana (GREGOROVIĆ I SUR., 2008). Najnoviju primjenu morfometrija nalazi u istraživanju simbiotskih odnosa (HANDA I SUR., 2006; KOVAČEVIĆ I SUR., 2005; MÜLLER-PARKER I PARDY, 1987).

1.7. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada je odrediti koncentraciju željeza koja ima subletalni i letalan učinak na hidru kao eksperimentalni organizam. U istraživanju su za eksperimentalne životinje korištene dvije vrste hidri, simbiotska zelena hidra (*Hydra viridissima*) i nesimbiotska smeđa hidra (*Hydra oligactis*). Cilj je i makroskopskim promatranjima utvrditi morfološke promjene i promjene u ponašanju eksperimentalnih organizama izazvane tretiranjem željezom. Histološke promjene praćene mikroskopskim promatranjem i morfometrijom su također su cilj ovog rada. I statističkom obradom podataka treba utvrditi da li željezo oštećuje ektoderm, mezogleju i gastroderm hidri. Istraživano je i da li je simbiotska vrsta hidri otpornija od nesimbiotske vrste hidri na preživljavanje u nepovoljnim uvjetima (mikro)okoliša.

Pokusi su izvođeni u Laboratoriju za evoluciju na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

2. MATERIЈAL I METODE

2.1. Materijal

Eksperimentalne životinje koje su korištene su zelena hidra (*Hydra viridissima* Pallas, 1766) i smeđa hidra (*Hydra oligactis* Pallas, 1766). Smeđa hidra uzorkovana je u jezerima u park šumi Maksimir dok je zelena hidra koja je u prijašnjim pokusima bila pronalazena u rukavcima Jarunskog jezera (KOVAČEVIĆ I SUR., 2009b) korištena i za ovaj pokus. Životinje su uzgajane u laboratorijskim uvjetima, zelena hidra pri temperaturi od 22,4 °C pri dnevnom svjetlu, a smeđa hidra pri 9 °C u hladnjaku. Čuvane su u aeriranoj vodi i hranjene ličinkama raka vrste *Artemia salina*. Jedinke bez pupova bile su stavljane u staklenu zdjelicu volumena 100 ml s 50 ml aerirane vode. Tijekom izvođenja pokusa životinje nisu bile hranjene.

2.2. Metode

Po pet jedinki zelenih i smeđih hidri tretirano je tijekom tri dana sa željezom (Fe) dodavanim u obliku željeznog dekstrana (FeD). Zelene hidre su radi poteškoće s nabavom tretirane samo sa željezom u koncentracijama od: 1 mg/L, 400 mg/L, 1400 mg/L, 1500 mg/L, 1600 mg/L i 4000 mg/L. Smeđe hidre tretirane su sa željezom u koncentracijama od: 0,5 mg/L, 1 mg/L, 4 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, 700 mg/L, 1000 mg/L, 1400 mg/L, 1500 mg/L, 1600 mg/L i 4000 mg/L.

2.3. Morfološke promjene

Tijekom pokusa pratila se smrtnost jedinki, reakcija na podražaj metalnom iglicom, migracija životinja u odnosu na kontrolni uzorak, odsutnost lovki, lučenje sluzi te nesporno razmnožavanje. Kontrahirani izgled i relaksiraniji izgled od kontrole praćeni su kao jedan parametar koji je označen kao promjena oblika tijela. Tijekom svakog od tri dana izvođenja pokusa životinje su promatrane pomoću lupe. Pojedini pokusi su ponavljani dva do tri puta.

2.4. Histokemijsko dokazivanje željeza

Za histološku analizu uzimane su kontrolne te preživjele jedinke zelenih i smeđih hidri tretirane sa željezom u koncentracijama od: 1 mg/L, 400 mg/L, 1400 mg/L i 1500 mg/L.

Jedinke su fiksirane u neutralnom formalinu 24 sata, a zatim uklopljene u paraplast. Uklopljene jedinke rezane su pomoću mikrotoma na rezove debljine 4 μm . Rezovi su deparaplastirani u ksilolu te dehidrirani u seriji alkohola od višeg prema nižem (100 %, 90 %, 80 %, 70 %) do destilirane vode (3 x 10 min). Za histokemijsko dokazivanje željeza deponiranog u tkivu hidri korištena je Perlova reakcija koja se temelji na inkubiranju rezova u mješavini 4 % kalijevog ferocijanida i 4 % kloridne kiseline 3 x 30 min. Rezovi su zatim ispirani u destiliranoj vodi te 3 min bojani u »nuclear fast red-u«. Nakon ispiranja u tekućoj vodi, rezovi su dehidrirani u rastućoj seriji alkohola (70 %, 80 %, 90 % i 100 %), prosvijetljeni u ksilolu 2 x 15 min i uklopljeni u »Kanada balzam«. Preparati su analizirani pomoću svjetlosnog mikroskopa Nikon Eclipse E600 i računalnog programa za morfometrijsku analizu histoloških slika LUCIA G 4.80. Mikroskopske slike snimljene su digitalnom kamerom NIKON DMX1200. Morfometrijski su obrađene površine odsječaka ektoderma i gastroderma dužine 100 μm i debljina mezogleje. Izmjeren je iznos 15 površina odsječaka gastroderma i ektoderma te 150 debljina mezogleje. Rezultati su obrađeni metodom deskriptivne statistike.

3. REZULTATI

3.1. Morfološke promjene zelene i smeđe hidre tretirane s Fe

3.1.1. Kontrolni uzorak zelene hidre i zelene hidre tretirane s 1 mg/L Fe

Sva tri dana 100 % jedinki kontrolnog uzorka lebdjelo je u sredini stupca vode u staklenoj zdjelici. Takav položaj smatrao se početnim i redovitim položajem hidri. Hidre su dobro reagirale na mehanički podražaj metalnom iglicom u bilo koje mjesto na tijelu. Lovke i tijelo su im bili relaksirani.

Prvog dana 100 % jedinki tretiranih s 1 mg/L Fe nije pokazivalo promjene u odnosu na kontrolni uzorak (Tablica 1). **Drugog i trećeg dana** je kod 40 % jedinki uočeno pupanje.

3.1.2. Zelene hidre tretirane s 400 mg/L Fe

Prvog dana 100 % jedinki je migriralo prema površini, 20 % jedinki slabije je reagiralo na mehanički podražaj. Kod svih jedinki je uočeno da pokušavaju obuhvatiti iglicu ako je podražaj bio oko lovki. Ako je podražaj bio oko stopala sve jedinke su se savijale u potkovasti oblik. **Drugog dana** pokusa bila je vidljiva migracija prema dnu zdjelice svih jedinki, ujedno su sve jedinke slabije reagirale na mehanički podražaj, a 20 % jedinki je bilo relaksiranije nego ostale. **Trećeg dana** 100 % jedinke je ostalo pri dnu zdjelice (Tablice 1, 2).

3.1.3. Zelene hidre tretirane s 1400 mg/L, 1500 mg/L, 1600 mg/L i 4000 mg/L Fe

Prvog dana pokusa tretiranja s 1400 mg/L Fe 100 % jedinki se nalazilo pri površini, pokazivale su jako slabu reakciju pri podražaju iglicom i bile su kontrahirane. **Drugog dana** je 100 % jedinki migriralo prema dnu zdjelice te se još kontrahiralo u odnosu na prethodni dan. **Trećeg dana** pokusa jedinke su bile pri dnu zdjelice okružene s dosta sluzi, potpuno kontrahirane, kuglastog oblika. Reakcija na podražaj je bila jako slaba.

U odnosu na kontrolu, 100 % jedinki tretiranih s 1500 mg/L Fe **prvog dana** pokusa je migriralo prema vrhu vodenog stupca u zdjelici. Prilikom podražaja iglicom reagirale su jako slabo, 100 % jedinki je bilo kontrahirano, a 20 % je bilo kontrahiranije od ostalih. **Drugog dana** 100 % jedinki je migriralo prema dnu zdjelice gdje je pokazivalo izrazitu tromost prilikom podražaja iglicom. **Trećeg dana** 60 % jedinki je bilo mrtvo, preostalih 40 % je bilo izrazito tromo i kontrahirano ležalo na dnu zdjelice okruženo sa sluzi.

Prvog dana 100 % jedinki tretiranih s 1600 mg/L Fe migriralo je prema vrhu stupca vode, kontrahirale su se, izrazito slabo su odgovarale na podražaj iglicom dok je **drugog dana** 100 % jedinki mijenjalo položaj prema dnu zdjelice gdje su bile okružene s dosta sluzi i zelenog sadržaja koji su vjerojatno bile izbačene alge. **Trećeg dana** 60 % jedinki je bilo mrtvo, 40 % je bilo tromo okruženo sa sluzi, izrazito kontrahirano, reduciranih lovki.

Prvog dana pokusa 100 % jedinki tretiranih s 4000 mg/L Fe je bilo okrenuto stopalom prema vrhu vodene površine, kontrahirano i jako slabo u odgovoru na mehanički podražaj. **Drugog dana** 60 % je bilo mrtvo, 40 % kuglasto bez lovki okruženo s dosta sluzi i zelenog sadržaja. **Trećeg dana** 100 % jedinki je bilo mrtvo, kuglastog oblika, bez lovki i ležalo u sluzi (Tablice 1-3).

Tablica 1. Migracija zelene hidre tijekom pokusa (%)

Fe/mg/L	1. DAN	2. DAN	3. DAN
K	0	0	0
1	0	0	0
400	100	100	100
1400	100	100	100
1500	100	100	40*
1600	100	100	40*
4000	100	40*	0*

Tablica 2. Promjena oblika tijela zelene hidre tijekom pokusa (%)

Fe/mg/L	1. DAN	2. DAN	3. DAN
K	0	0	0
1	0	0	0
400	0	20	20
1400	100	100	100
1500	100	100	40*
1600	100	100	40*
4000	100	40*	0*

* preostale jedinke su mrtve

Tablica 3. Smrtnost zelene hidre tijekom pokusa (%)

Fe/mg/L	1. DAN	2. DAN	3. DAN
K	0	0	0
1	0	0	0
400	0	0	0
1400	0	0	0
1500	0	0	60
1600	0	0	60
4000	0	60	100

3.1.4. Kontrolni uzorak smeđe hidre i smeđe hidre tretirane s 0,5 mg/L, 1 mg/L, 4 mg/L, 10 mg/L i 20 mg/L Fe

Od prvog do trećeg dana u kontrolnom uzorku sve jedinke su lebdjele u sredini stupca vode u zdjelice. Dobro su odgovarale na mehanički podražaj metalnom iglicom, nisu lučile sluzi, lovke su bile ispružene i tijelo je bilo relaksirano.

Od prvog do trećeg dana kod jedinki tretiranih koncentracijom 0,5 mg/L Fe nije došlo do promjena niti u jednom parametru.

Od prvog do trećeg dana kod jedinki tretiranih koncentracijom 1 mg/L Fe nije došlo do promjena niti u jednom parametru.

Prvi dan pokusa 100 % jedinki tretiranih koncentracijom 4 mg/L Fe nije pokazivalo promjene niti u jednom parametru. **Drugog i trećeg dana** pokusa bila je primijećena migracija 100 % jedinki prema vrhu stupca vode u zdjelici.

Prvi dan pokusa 100 % jedinki tretiranih koncentracijom 10 mg/L Fe plutalo je bliže dnu stupca vode u zdjelice. **Treći dan** 100 % jedinki migriralo je na vrh vodene površine.

Prvog dana 100 % jedinki tretiranih koncentracijom 20 mg/L Fe plutalo je pri dnu stupca vode u zdjelici. **Drugog dana** je 40 % jedinki je migriralo prema vrhu stupca vode u zdjelici i stopalom bilo okrenuto prema površini, a 60 % je bilo na dnu zdjelice (Tablica 4). **Trećeg dana** 20 % jedinki je slabije reagiralo na podražaj iglicom.

3.1.5. Smeđe hidre tretirane s 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, 700 mg/L i 1000 mg/L Fe

Prvog dana 100 % jedinki tretiranih koncentracijom 100 mg/L Fe plutalo je pri sredini stupca vode u zdjelici i dobro odgovaralo na mehanički podražaj. Lovke i tijelo su bili relaksirani. **Drugog dana** 40 % jedinki je migriralo prema vrhu vodenog stupca dok je 60 % bilo na dnu. **Trećeg dana** jedinke na dnu su se kontrahirale i slabije odgovarale na mehanički podražaj.

Prvog dana pokusa 100% jedinki tretiranih koncentracijom 200 mg/L Fe je bilo u sredini stupca vode u zdjelici, dobro je odgovaralo na mehanički podražaj. Ako je hidra bila dodirnut iglicom oko lovki pokušavala je lovka obuhvatiti iglicu. Ukoliko je podražaj bio oko stopala hidra se savijala u potkovasti oblik. Ova dva događaja primijećena su kod svih jedinki. **Drugi dan** 40 % jedinki je migriralo prema površini, a 60 % prema dnu. Jedinke na dnu su bile kontrahirane i slabije reagirale na podražaj. **Trećeg dana** još je 20 % jedinki migriralo prema površini. Sve su jedinke bile kontrahirane, a 40 % jedinki na dnu je bilo jako kontrahirano i uvučenih lovki.

Prvog dana pokusa 100% jedinki tretiranih koncentracijom 400 mg/L Fe lebdjelo je pri dnu zdjelice, bile su dosta relaksirane u odnosu na kontrolu i dobro reagirale na mehanički podražaj. Također je primijećeno da hidre pokušavaju obuhvatiti iglicu ako ih se doticalo oko lovki. Ako su iglicom podražene oko stopala, savinule bi se u potkovasti oblik. Ovakvo ponašanje je bilo prisutno kod 100 % jedinki. **Drugi dan** je 40 % jedinki migriralo je na površinu, a 60 % se spustilo na dno zdjelice. Jedinke na dnu slabije su reagirale na mehanički podražaj.

Prvog dana pokusa 100 % jedinki tretiranih koncentracijom 700 mg/L Fe je bilo pri dnu zdjelice u lebdećem položaju. Bile su kontrahirane i dobro reagirale na podražaj. **Drugog dana** 40 % jedinki je migriralo na površinu te su one su brže reagirale na mehanički podražaj od jedinki pri dnu. **Trećeg dana** je 60 % jedinki koje su bile pri dnu još sporije reagirale prilikom mehaničkog podražaja.

Prvog dana 100 % jedinki tretiranih koncentracijom 1000 mg/L Fe je bilo kontrahirano pri dnu zdjelice. **Drugog dana** 60 % jedinki je migriralo na površinu, a 40 % jedinki je bilo na dnu zdjelice. Oko jedinki na dnu zdjelice je bilo sluzi. **Trećeg dana** jedinke na dnu jako sporo su reagirale na mehanički podražaj i dosta su se kontrahirale (Tablice 4 i 5).

3.1.6. Smeđe hidre tretirane s 1400 mg/L, 1500 mg/L, 1600 mg/L i 4000 mg/L Fe

Prvog dana 100 % jedinki tretiranih koncentracijom 1400 mg/L Fe je bilo pri dnu zdjelice. Bile su kontrahirane, okružene sa sluzi i slabije odgovarale na podražaj iglicom. **Trećeg dana** 60 % jedinki je bilo mrtvo. Preostalih 40 % je bilo kontrahirano, reduciranih lovki i jako slabog odgovora na podražaj.

Prvog dana tretiranja koncentracijom 1500 mg/L Fe 60 % jedinki je bilo pri dnu zdjelice. Bile su izrazito trome i kontrahirane, uvučenih lovki, ostalih 40 % jedinki je migriralo na vrh zdjelice. **Drugog dana** jedinke pri dnu bile su gotovo kuglastog oblika i jako slabo i sporo odgovarale na mehanički podražaj. Bile su okružene s dosta sluzi. **Trećeg dana** 60 % jedinki je bilo mrtvo, a preostalih 40 % je bilo tromo i kontrahirano pri dnu zdjelice.

Prvog dana 100 % jedinki tretiranih koncentracijom 1600 mg/L Fe migriralo je na površinu, bile su kontrahirane i trome. **Drugog dana** 40 % jedinki je bilo kuglastog oblika, okruženo sa sluzi i reduciranih lovki na dnu zdjelice, jako tromo je reagiralo na podražaj, 60 % je mrtvo. **Trećeg dana** 80 % je bilo mrtvo.

Prvog dana 100 % jedinki tretiranih koncentracijom 4000 mg/L Fe je bilo jako kontrahirano uvučenih lovki pri površini. Bile su jako trome. **Drugog dana** 80 % jedinki je bilo mrtvo, okruženo sa sluzi, **treći dan** 100 % jedinki je bilo mrtvo (Tablice 4-6).

Tablica 4. Migracija smeđe hidre tijekom pokusa (%)

Fe/mg/L	1. DAN	2. DAN	3. DAN
K	0	0	0
0,5	0	0	0
1	0	0	0
4	0	100	100
10	100	100	100
20	100	100	100
100	0	100	100
200	0	100	100
400	100	100	100
700	100	100	100
1000	100	100	100
1400	100	100	40*
1500	100	100	40*
1600	100	40*	20*
4000	100	20*	0*

Tablica 5. Promjena oblika tijela smeđe hidre tijekom pokusa (%)

Fe/mg/L	1. DAN	2. DAN	3. DAN
K	0	0	0
0,5	0	0	0
1	0	0	0
4	0	0	0
10	0	0	0
20	0	0	0
100	0	0	60
200	0	60	40
400	100	100	100
700	100	100	100
1000	100	100	100
1400	100	100	40*
1500	100	100	40*
1600	100	40*	20*
4000	100	20*	0*

* preostale jedinke su mrtve

Tablica 6. Smrtnost smeđe hidre tijekom pokusa (%)

Fe/mg/L	1. DAN	2. DAN	3. DAN
K	0	0	0
0,5	0	0	0
1	0	0	0
4	0	0	0
10	0	0	0
20	0	0	0
100	0	0	0
200	0	0	0
400	0	0	0
700	0	0	0
1000	0	0	0
1400	0	0	60
1500	0	0	60
1600	0	60	80
4000	0	80	100

3.2. Histološke promjene zelene i smeđe hidre tretirane s Fe

3.2.1. Kontrolni uzorak zelene i smeđe hidre

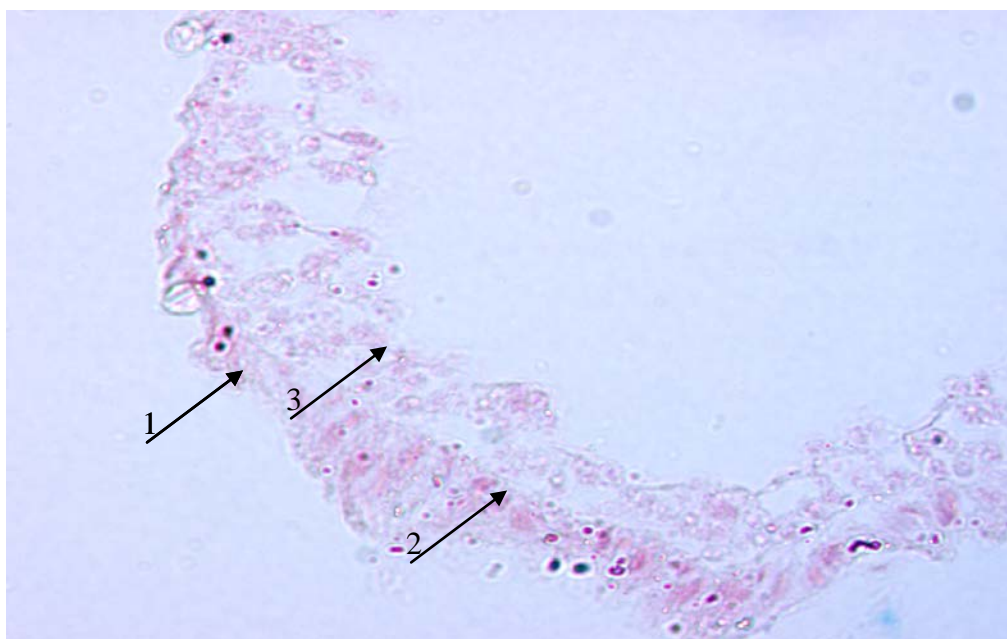
Stanični slojevi **zelene hidre** bili su pravilni, neoštećeni i jasno razlučivi, a mezogleja je bila debela i neprekinuta. U ektodermu su bile redovito prisutne intersticijske stanice, a u gastrodermu zimogene. Površina odsječka ektoderma duljine 100 μm bila je 3686,9 μm^2 ($\pm 662,5$), gastroderma 3233,7 μm^2 ($\pm 548,8$), a debljina mezogleje bila je 1,21 μm ($\pm 0,49$).

Kod jedinki **smeđe hidre** također su bili uočljivi svi stanični slojevi. Mezogleja je bila dobro vidljiva i kontinuirana. Intersticijske i zimogene stanice su prisutne i dobro vidljive. Površina odsječaka ektoderma duljine 100 μm bila je 3673,1 μm^2 ($\pm 822,4$), a gastroderma 6441,0 μm^2 ($\pm 1258,8$). Debljina mezogleje bila je 1,92 μm ($\pm 1,0$).

U kontrolnom uzorku zelene i smeđe hidre nisu nađene depozicije željeza (Slike 6-11, Tablica 7).

3.2.2. Zelena i smeđa hidra tretirane s 1 mg/L Fe

Stanični slojevi **zelene hidre** bili su dobro su uočljivi i cjeloviti kao kod kontrolnog uzorka. Ektoderm je bio ravan. Mjestimično su bile vidljive knide. Mezogleja je bila kontinuirana i dobro vidljiva. Gastralna šupljina je bila prazna i bez vidljivih oštećenja. Površina odsječka ektoderma bila je $1214,7\mu\text{m}^2$ ($\pm 583,0$), a gastroderma $876,15\mu\text{m}^2$ ($\pm 246,4$). Debljina mezogleje je $1,12\mu\text{m}$ ($\pm 0,46$). Depozicije željeza nisu uočene (Slika 4).



Slika 4. Mikroskopska snimka histološkog preparata zelene hidre trećeg dana tretiranja sa željezom koncentracije 1 mg/L. Strelice prikazuju: 1 ektoderm, 2 mezogleja, 3 gastroderm. Perlova reakcija x 1000X. Foto: Ana Matijević.

Smeđa hidra imala je također dobro uočljive stanične slojeve. Površina ektoderma bila je nazubljena te prekrivena mukusom. U ektodermu je bilo prisutno dosta intersticijskih stanica. Mezogleja je bila debela i neprekinuta. Gastroderm je bio bez vidljivih oštećenja. Površina ektoderma bila je $3940,4\mu\text{m}^2$ ($\pm 416,0$), a gastroderma $6196,9\mu\text{m}^2$ ($\pm 1840,0$). Debljina mezogleje bila je $2,50\mu\text{m}$ ($\pm 0,9$). Depozicije željeza nisu uočene (Slike 6-11, Tablica 7).

3.3.3. Zelena i smeđa hidra tretirane s 400 mg/L Fe

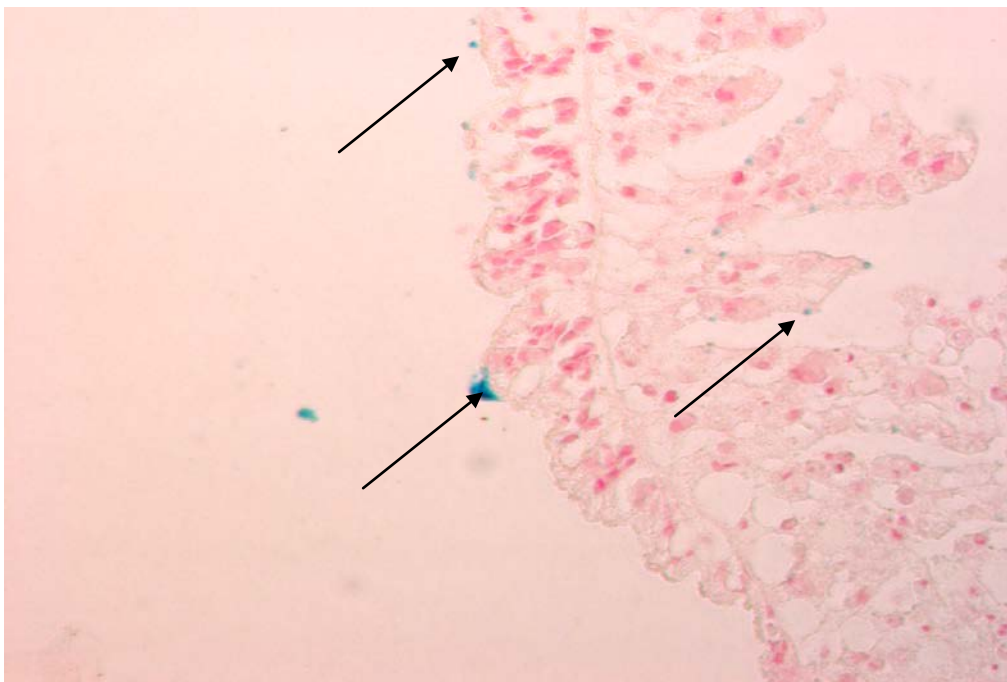
Stanični slojevi **zelene hidre** bili su dobro očuvani. U ektodermu nisu nađene intersticijske stanice, ali su bile uočene knide duž tijela prema stopalu. Apikalno su nađene depozicije željeza. Mezogleja nije bila oštećena. Gastroderm je sadržavao dosta zimogenih stanica koje nisu bile diferencirane i nešto knida. Površina odsječka ektoderma bila je $1167,0 \mu\text{m}^2 (\pm 143,5)$, a odsječka gastroderma $3192,0 \mu\text{m}^2 (\pm 554,0)$. Debljina mezogleje je $1,58 \mu\text{m} (\pm 0,57)$ (Slika 8).

Smeđa hidra je bila slična kontroli. U ektodermu su nađene depozicije željeza apikalno, a sadržavao je i veći broj knida. Mezogleja nije bila oštećena za razliku od gastroderma koji je sadržavao veću amorfnu masu stanica. Površina odsječka ektoderma bila je $5058,1 \mu\text{m}^2 (\pm 361,3)$, a odsječka gastroderma $7697,0 \mu\text{m}^2 (\pm 1472,7)$. Debljina mezogleje bila je $4,18 \mu\text{m} (\pm 1,40)$ (Slike 6-11, Tablica 7).

3.3.4. Zelena i smeđa hidra tretirane s 1400 mg/L Fe

Ektoderm **zelene hidre** bio je djelomično oštećen, a izgledom je bio sličan ektodermu hidri tretiranih s 400 mg/L Fe. U ektodermu su vidljive depozicije željeza i knide. Mezogleja je bila kontinuirana. Gastroderm je bio reduciran, a dijelovi gastroderma nalazili su se u gastralnoj šupljini. Stanice u gastrodermu čije membrane nisu bile kontrastne sadržavale su dosta depozicija željeza. Endosimbiotske alge u gastrodermalnim mioepitelnim stanicama nisu bile kontrastne. Površina odsječka ektoderma bila je $730,8 \mu\text{m}^2 (\pm 211,9)$, a odsječka gastroderma $2202,1 \mu\text{m}^2 (\pm 216,7)$. Debljina mezogleje bila je $1,94 \mu\text{m} (\pm 0,73)$.

U **smeđe hidre** uslijed velikog oštećenja nije bilo kontrastnosti među tri sloja. Većina stanica bila je u raspadu, a nađena je i masa amorfnih stanica. Depozicije željeza bile su prisutne u ektodermu i gastrodermu, a knide po cijelom tijelu. Površina odsječka ektoderma bila je $2924,4 \mu\text{m}^2 (\pm 566,0)$, a gastroderma $2028,8 \mu\text{m}^2 (\pm 475,3)$. Debljina mezogleje bila je $3,27 \mu\text{m} (\pm 1,47)$ (Slike 6-11, Tablica 7).

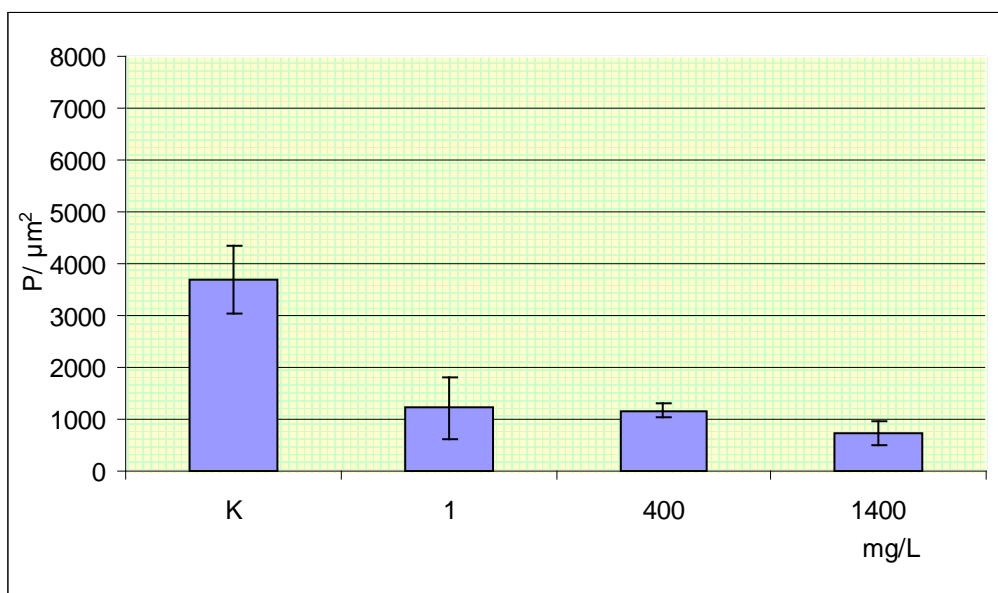


Slika 5. Mikroskopska snimka histološkog preparata smeđe hidre trećeg dana tretiranja sa željezom koncentracije 1400 mg/L. Strelice pokazuju plave depozicije željeza. Perlova reakcija x 1000X. Foto: Ana Matijević.

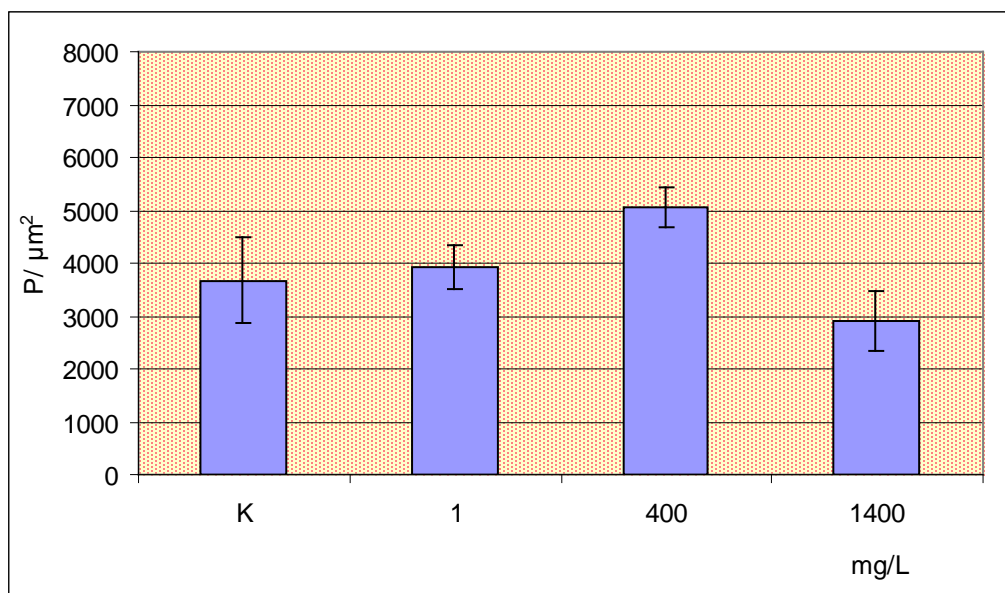
3.3.5. Zelena i smeđa hidra tretirane s 1500 mg/L Fe

U **zelene hidre** uočeno je miješanje slojeva. Nađeno je dosta knida i depozicija željeza u ektodermu i gastrodermu. Nisu se uočavale zimogene regenerativne stanice.

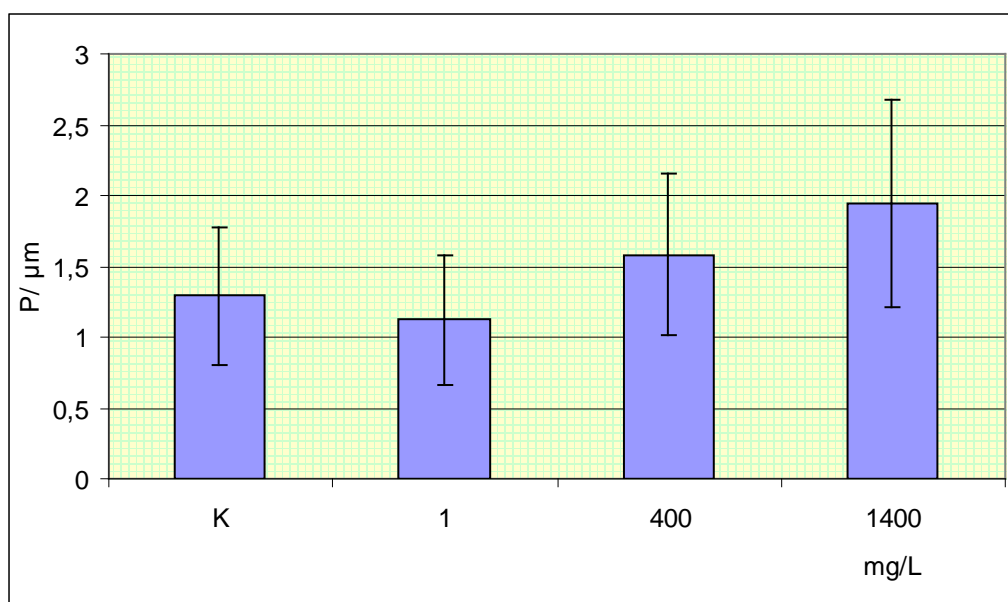
Ektoderm i gastroderm **smeđe hidre** bili su jako oštećeni, dok je mezogleja bila još uvijek vidljiva. Nađeno je dosta depozicija željeza u ektodermu i gastrodermu. U ektodermu su bile vidljive knide. Puno je stanica bilo u gastralnoj šupljini. Oštećenja kod **zelene i smeđe hidre** su bila velika što je onemogućavalo mjerenja (Tablica 7).



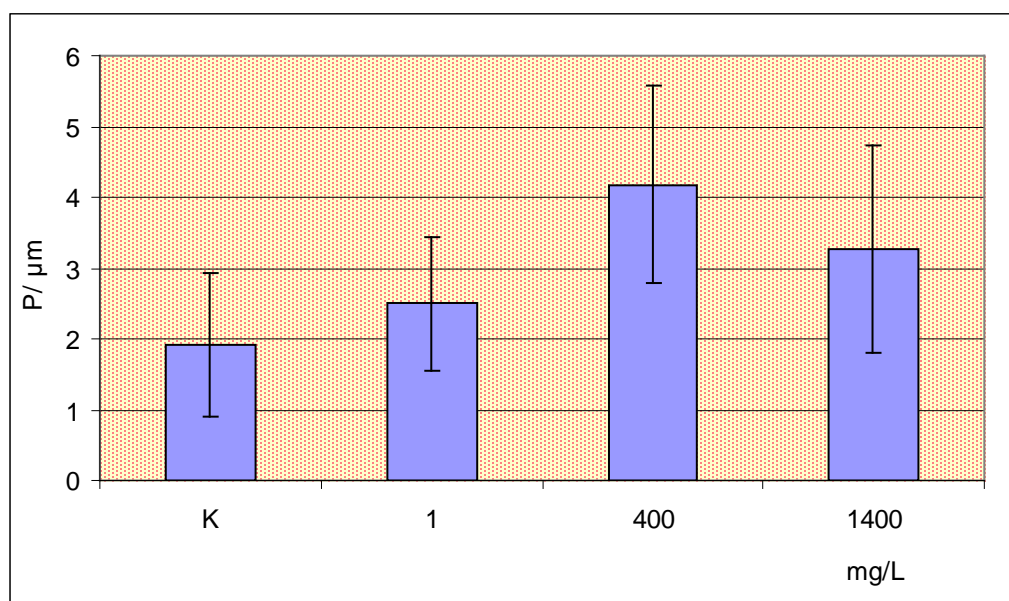
Slika 6. Grafički prikaz odnosa površine ektoderma zelene hidre odsječka dužine 100 μm i koncentracije željeza trećeg dana tretmana



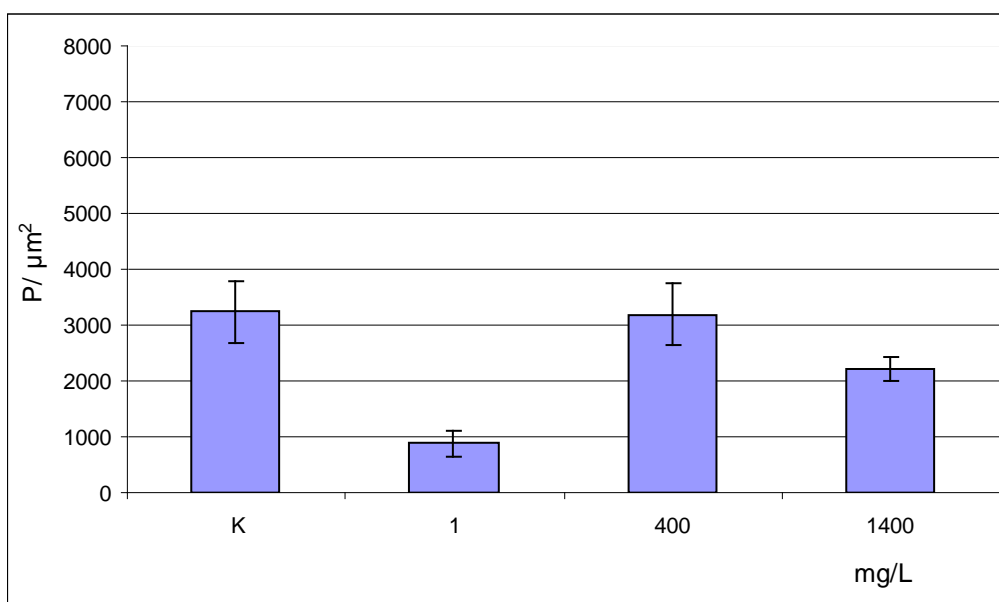
Slika 7. Grafički prikaz odnosa površine ektoderma smeđe hidre odsječka dužine 100 μm i koncentracije željeza trećeg dana tretmana



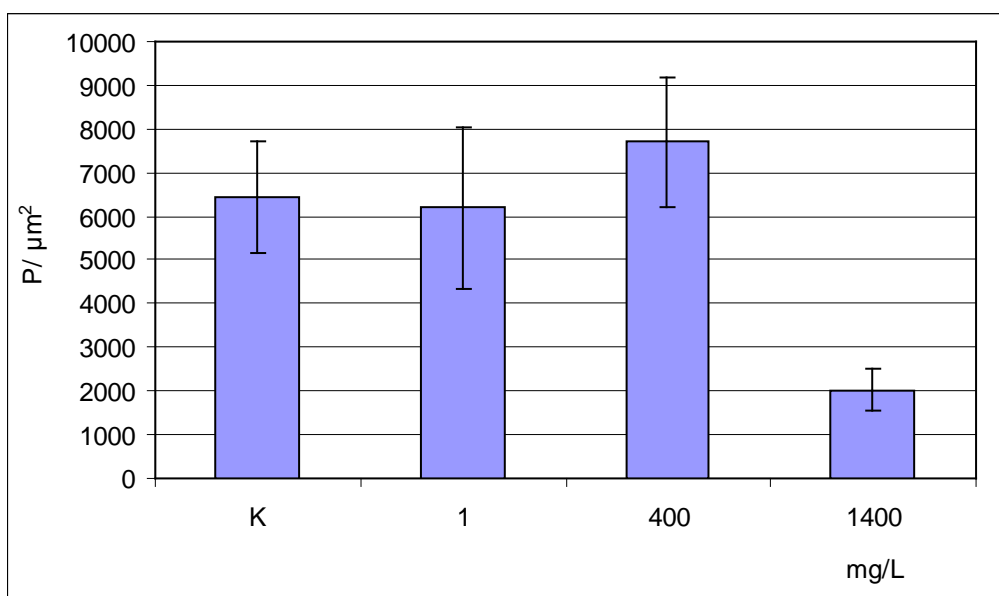
Slika 8. Grafički prikaz odnosa debljine mezogleje zelene hidre i koncentracije željeza trećeg dana tretmana



Slika 9. Grafički prikaz odnosa debljine mezogleje smeđe hidre i koncentracije željeza trećeg dana tretmana



Slika 10. Grafički prikaz odnosa površine gastroderma zelene hidre odsječka dužine 100 μm i koncentracije željeza trećeg dana tretmana



Slika 11. Grafički prikaz odnosa površine gastoderma smeđe hidre odsječka dužine 100 μm i koncentracije željeza trećeg dana tretmana

Tablica 7. Depozicije željeza distribuirane u tijelu hidre tijekom pokusa

Fe/mg/L	Zelena hidra		Smeđa hidra	
	Ektoderm	Gastroderm	Ektoderm	Gastroderm
K	-	-	-	-
1	-	-	-	-
400	+	-	+	-
1400	+++	++	+++	++
1500	+++	+++	+++	+++

(- nema vidljivih depozicija, + pojedinačne točkaste depozicije, ++ depozicije u obliku točkastih nakupina, +++ depozicije u obliku plavih površina)

4. RASPRAVA

Teški metali, pesticidi i razni drugi umjetno stvoreni kemijski spojevi ispuštaju se u zemlju ili zrak. Posljedica toga je da ti spojevi, a tako i elementi koji ih sačinjavaju završe u akvatičkim ekosustavima. Željezo je esencijalan metal, no njegova povećana koncentracija u vodi uzrokuje štetne posljedice za akvatičke organizme. Brojna istraživanja na beskralježnjacima (KALAFATIĆ, 1987; KALAFATIĆ I KOPJAR, 1995) te kralježnjacima (GREGOROVIĆ I SUR., 2008) pokazala su da dugotrajna izloženost dopuštenim koncentracijama metala i antibiotika kao i kratkotrajna izloženost većima koncentracijama od dozvoljenih (KOVAČEVIĆ I SUR., 2009a) ostavljaju različita reverzibilna i ireverzibilna oštećenja u metaboličkim ili drugim procesima kod promatranih test životinja.

Ovo je prvo dokumentirano istraživanje o učinku željeza na hidru. Koristili smo veliki raspon koncentracija željeza od 0,5 mg/L do 4000 mg/L za smeđu hidru kako bismo odredili subletalnu (LC_{50}) i letalnu (LC_{100}) koncentraciju. Smeđa hidra je bila lakše dostupna nego zelena. Pretpostavili smo da će LC_{50} i LC_{100} za zelenu hidru biti sličnih vrijednosti kao i za smeđu te su stoga neke koncentracije za zelenu hidru izostavljene.

Praćene su morfološke promjene. Zelena i smeđa hidra u kontrolnom uzorku su tijekom sva tri dana plutale pri sredini vodenog stupca u zdjelici. Ovaj položaj hidri u eksperimentalnoj posudici smatrao se početnim položajem. Kod nižih subletalnih koncentracija željeza nastavljeno je ovakvo ponašanje uz migracije prema površini vode i dnu zdjelice. Ovakvo ponašanje hidre su pokazale i u tretiranju s drugim metalima poput aluminija (KOVAČEVIĆ I SUR., 2007). Migracije su mogući rezultat traženja povoljnijih uvjeta (mikro)okoliša.

Kod kontrolnog uzorka obje vrste su reagirale na podražaj metalnom iglicom. Tretiranjem sa željezom i povećanjem koncentracije hidre su sve sporije reagirale na podražaj, osobito smeđa hidra. To može ukazivati na to da je željezo toksikant koji utječe na živčani sustav hidre i smanjuje njegovu funkciju dok pri višim subletalnim koncentracijama potpuno onemogućuje hidru. Odgovor na živčani podražaj ovisio je i o mjestu podražaja životinje. Ako je podražaj bio u području stopala, životinja se savijala u potkovasti oblik, dok je u području lovki ispružila lovke i pokušavala obuhvatiti iglicu. Smatra se da su živčane stanice kod hidre odgovorne za njen urođeni imunitet i veza između živčanog i imunološkog sustava je jedan od početnih evolucijskih mehanizama (KASAHARA I BOSCH, 2003).

Oblik tijela zelene i smeđe hidre u kontrolnom uzorku bio je relaksiran tijekom sva tri dana pokusa. Kod tretiranih životinja niže koncentracije željeza čiji smo širi raspon pratili kod smeđe hidre nisu pokazivale razliku u izgledu tijela životinje u odnosu na kontrolu. Zelena hidra počela se jako relaksirati kod koncentracije od 400 mg/L, a oko te koncentracije mijenjao se i izgled smeđe hidre. Primijetili smo i jako kontrahirani izgled smeđe hidre,

pogotovo kod jedinki koje su pri dnu zdjelice u odnosu na kontrolni uzorak. Zelena hidra se puno više relaksirala u odnosu na kontrolni uzorak nego smeđa. Kako se povećavala koncentracija željeza, zelena i smeđa hidra su se sve više kontrahirale. Visoke subletalne koncentracije djeluju na izgled zelene i smeđe hidre tako da se one kontrahiraju gotovo do kuglastog oblika. Ovaj oblik tijela javljao se kod koncentracije željeza gdje se na histološkom preparatu moglo uočiti miješanje staničnih slojeva kod smeđe hidre. Promjena oblika hidri prema kuglastom obliku znači smanjenje površine tijela, a tako i difuzije štetnih tvari iz okoliša. Kontrakcija i relaksacija također su poznati mehanizmi obrane od nepovoljnih uvjeta života (ŽNIDARIĆ I SUR., 1995). Izgled tijela zelene hidre se promijenio kod koncentracije 400 mg/L kada se počela jako relaksirat drugog dana pokusa, ali ne kod svih jedinki. Većina jedinki smeđe hidre promijenila je svoj oblik i kontrahirala se kod koncentracije 100 mg/L trećeg dana pokusa. Kod koncentracije 400 mg/L sve jedinke smeđe hidre su promijenile oblik tijela u relaksirani prvog dana pokusa. Smeđa hidra je prije mijenjala oblik tijela od zelene kao način obrane od nepovoljnih uvjeta (mikro)okoliša.

Pri nižim koncentracijama željeza neke jedinke zelene hidre su pupale tj. nesporno se razmnožavale. Nespolno razmnožavanje kod hidri javlja se kod povoljnih uvjeta u okolišu. Kako se to dogodilo pri tretiranju nižim koncentracijama željeza možemo reći da je ono imalo hormestički učinak na zelenu hidru (STEBBING, 1982). Ova pojava obrazlaže se povećanjem volumena i diferencijacije stanica (KALAFATIĆ I KOPJAR, 1994; KALAFATIĆ I SUR., 1991; ŽNIDARIĆ I SUR., 1987). Za razliku od zelene smeđa hidra nije pupala.

Osnovni parametar toksičnosti željeza bila je smrtnost zelene i smeđe hidre kod pojedinih koncentracija željeza. Iz rezultata je vidljivo da je LC_{50} za zelenu hidru bila je od 1400 mg/L do 1500 mg/L, a za smeđu ispod 1400mg/L. Životinje su ugibale uglavnom trećeg dana pokusa tj. nakon 72 sata tretiranja željezom. Uspoređujući koncentracije pri kojima je određena LC_{50} aluminijska (KOVAČEVIĆ I SUR., 2007) i LC_{50} željeza, zelena i smeđa hidra su pokazale da mogu preživjeti pri tretiranju višim koncentracijama željeza.

Osim morfoloških pratili smo i histološke promjene kao i akumuliranje željeza u staničnim slojevima hidre. Za praćenje histoloških promjene izabrane su koncentracije željeza: 1 mg/L radi toga jer je to dozvoljena koncentracija željeza u kopnenim vodama, 400 mg/L jer se pri toj koncentraciji događaju veće morfološke promjene, te koncentracije 1400 mg/L i 1500 mg/L koje su bile oko LC_{50} za zelenu i smeđu hidru. Željezo u tkivu hidre vidjelo se kao plavo obojene depozicije. Željezo je nađeno u tijelu obje vrste hidri tek pri višim koncentracijama i to u oba stanična sloja. Iako depozicije željeza nisu nađene u mezogleji kod mjerenja debljine mezogleje ona je bila značajno različita. Mezogleja je građena od spojeva

sličnih kolagenu i elastinu. Pretpostavlja se da mezogleja može predstavljati barijeru (KOVAČEVIĆ I SUR., 2009b) te je tretiranje željezom moglo prouzročiti da se njeni građevni sastojci pojačano sintetiziraju i radi toga se i njezina debljina mogla povećati. Nije isključeno ni odabiranje mjesta rezanja histoloških preparata koje je bilo slučajno odabrano. Postoji mogućnost da su uzorci bili prerezani na stopalu hidre i da je mezogleja mjerena na stopalu hidre bila deblja. Možda je nestanična građa mezogleje razlog zašto ona ostaje relativno dobro očuvana tijekom pokusa.

Pri nižim koncentracijama željeza stanični slojevi su bili konzistentni i izgledom nalik kontroli. Kod smeđe hidre ektoderm je bio djelomično nazubljen i uočavalo se ispuštanje sluzi, što je možda značilo određenu dozu oštećenja ektoderma, odnosno vanjskog mukoznog sloja. Takva oštećenja vanjskog mukoznog sloja zabilježena su i kod tretiranja različitim pesticidima (KALAFATIĆ, 1997). Lučenje povećane količine sluzi rezultat je oštećenja ektodermalnih mioepitelnih stanica, najviše njihovih sekrecijski aktivnih apikalnih dijelova (ŽNIDARIĆ, 1971).

Depozicije željeza u zelene i smeđe hidre pri koncentraciji od 400 mg/L su bile vidljive, a dediferencijacija i migracije zimogenih stanica nije uočena. To znači da ova koncentracija željeza nije uzrokovala oštećenja koja zahtijevaju dediferencijaciju zimogenih stanica u ostale tipove stanica i njihovu migraciju na mjesto oštećenja. No, u zelene hidre nisu uočene intersticijske stanice u gastrodermalnim mioepitelnim stanicama, a to upućuje na regenerativne procese. Depozicije željeza su u ektodermu uočene isključivo u apikalno. Distribucija depozicija željeza bila je podjednaka u zelene i smeđe hidre. Depozicije su prvo uočavane u ektodermu, a zatim u gastrodermu, što se može povezati s putem ulaska toksikanta u tijelo životinja. Depozicije željeza u apikalnom djelu ektodermalnih stanica i kod zelene i smeđe hidre ukazuju na mogućnost odstranjivanja toksikanta iz stanica putem sekrecije sluzi. Odstranjivanje toksikanta putem sekrecije sluzi uočeno je i kod tretiranja aluminijem (KOVAČEVIĆ I SUR., 2007). Knide su uočene i kod nižih koncentracija, a njihov broj se povećava proporcionalno s koncentracijom željeza. Knide su pri oštećenju stanica ispadale po čitavom tijelu životinje.

Pri koncentracije od 1400 mg/L ektoderm zelene hidre bio je oštećen, a gastroderm reduciran. Depozicije željeza bile su prisutne su u oba stanična sloja. Pri koncentraciji od 1400 mg/L koja je bila oko LC_{50} za smeđu hidru depozicije željeza su uočene u oba sloja. Primijećene su stanice u raspadu te nekontrastnost staničnih slojeva, što upućuje na oštećenja.

Pri koncentraciji od 1500 mg/L koja je bila oko LC_{50} za zelenu hidru, došlo je do miješanja staničnih slojeva pri čemu je olakšana migracija stanica kroz slojeve. Regenerativne stanice

nisu uočene pa možemo pretpostaviti da su one iskorištene za regeneraciju hidri dediferencijacijom u druge tipove stanica. Moguće da je regeneracija kod zelene hidre bila brža, nego kod smeđe hidre i radi toga je preživjela pri višim koncentracijama željeza. Kod smeđe hidre oporavak je također bio moguć s obzirom da je bilo regenerativnih stanica. Pri koncentraciji 1500 mg/L gastroderm smeđih hidri bio je jako oštećen i gastralna šupljina je bila ispunjena nakupinama stanica.

Zelena hidra sadrži simbiotske zelene alge. One nisu bile kontrastne u gastrodermalnim mioepitelnim stanicama pri tretiranju željezom visoke subletalne koncentracije.

Prilikom tretiranja zelene i smeđe hidre s bakrom, kadmijem i cinkom (KARTANUT I PASCOE, 2002) smeđa hidra je preživljavala pri višim koncentracijama metala od zelene. Moguće objašnjenje leži u smanjenju genskog fonda nastalog nespolnim razmnožavanjem u laboratoriju (PYATT I DOD, 1986), a bakar se može smatrati i određenim algicidom. Zelena hidra ima najmanji genom od svih vrsta hidri i za pretpostaviti je da je ona radi toga bila polazna vrsta od koje su nastale ostale vrste hidri kao i da je simbiotski odnos bio nužan za evoluciju hidri. Različita veličina genoma kod srodnih vrsta kao što su različite vrste hidri poznata je kao «c vrijednosni paradoks», ali značenje toga je nepoznato (ZACHARIAS I SUR., 2004). Zabilježeno je i da pojedini metali mogu stimulirati sintezu nukleotida kod pojedinih koncentracija metala (LEVIS I SUR., 1975) ili nespolno razmnožavanje poput kroma (KALAFATIĆ, 1987) i aluminija.

Diferencijacija matičnih stanica hidre i njena moć regeneracije složeni je mehanizam i još uvijek nije jasno zašto on nije moguć kod razvijenijih životinja (SIEBERT I SUR., 2005). U daljnjim istraživanjima taj mehanizam regeneracije u hidri bilo bi potrebno evolucijski razjasniti još više i usporediti i povezati s razvijenijim životinjama. Danas je liječenje matičnim stanicama kod čovjeka izazov suvremene medicine. Metodama molekularne biologije bilo bi dobro istražiti koliko je mehanizam nastanka zrelih stanica iz matičnih stanica kod razvijenih oblika sličan mehanizmu regeneracije kod hidre i da li ima zajedničkih poveznica.

5.ZAKLJUČAK

1. Željezo je toksikant koji je uzrokovao morfološke i histološke promjene kod zelene i smeđe hidre. Visoke koncentracije željeza su letalne za obje vrste.
2. Migracija zelene i smeđe hidre je prva vidljiva promjena koja se dešava pri tretiranju hidri željezom.
3. Hidre reagiraju na tretiranje željezom promjenom oblika tijela, koji može biti od potpuno relaksiranog do potpuno kontrahiranog oblika.
4. Željezo se deponira u ektodermu i gastrodermu hidri. Oštećenja staničnih slojeva rastu s porastom koncentracije željeza. U mezogleji nije bilo depozicija željeza, ali se njezina debljina povećavala prilikom tretiranja sa željezom.
5. Željezo oštećuje stanice hidri i knide ispadaju po njihovom tijelu. Broj ispalih knida se povećava proporcionalno s povišenjem koncentracije željeza.
6. Pri nižim koncentracijama toksikant se nakuplja u apikalnom dijelu ektodermalnih stanica te ga hidre mogu odstraniti putem sluzi.
7. Željezo pri nižim koncentracijama izaziva pupanje zelene hidre tj. uzrokuje hormestički učinak.
8. Simbiotska zelena hidra preživljavala je pri višim koncentracijama željeza od nesimbiotske smeđe hidre što znači da je zelena hidra otpornija na izloženost željezu od smeđe.

6. LITERATURA

- Andrews N.C. (2002): The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol.* **31**: 991-994.
- Bacon B.R., Britton R.S. (1990): The pathology of hepatic iron overload: A free radical-mediated process? *Hepatology* **11**: 127-137.
- Burnett A.L. (1973): *Biology of hydra*. Academic Press, New York i London
- Carlsen C.U., Moller K.S., Skibsted L.H. (2005): Heme-iron in lipid oxidation. *Coord Chem Rev* **249**: 485-928.
- Dunn K. (1987): Growth of endosymbiotic algae in the green hydra, *Hydra viridissima*. *J Cell Sci* **88**: 571-578.
- Gregorović G., Kralj-Klobučar N., Kopjar N. (2008): A histological and morphometric study on the tissue and cellular distribution of iron in carp *Cyprinus carpio* L. During chronic waterborne exposure. *J Fish Biol* **72**: 1841-1846.
- Gribben P.E ., Creese R.G., Hooker S.H. (2001): The reproductive cycle of the New Zeland venus clam *Ruditapes Largillierti*. *J Shellfish Res.* **20**: 1101-1108.
- Gurzau E.S., Neagu C., Gurzau A.E. (2003): Essential metals-case study on iron. *Ecotoxicol Environ Saf* **56**: 190-200.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1990): Role of free radicals and catalytic metal ion sin human disease: An overreview. *Methods Enzymol* **186**:1-86.
- Handa S., Nakahara M., Tsuboa H., Deguchi H., Masuda Y., Nakano T. (2006): *Choricystis minor* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) as a symbiont of several species of freshwater sponge. *Hikobia* **14**: 365-373
- Holstein M., Emschermann P. (1995): *Cnidaria: Hydrozoa, Kamptozoa*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

- Hwang J.S., Ohyanagi H., Hayakawa S., Osato N., Nishimiya-Fujisawa C., Ikeo K., David CN., Fujisawa T., Gojobori T. (2007): The evolutionary emergence of cell type-specific genes inferred from the gene expression analysis of Hydra. PNAS **104**: 14735-14740.
- Kalafatić M. (1987): Effects of $K_2Cr_2O_7$ upon regeneration of hypostome and foot of hydra (*Hydra vulgaris*). Biol Bratislava **42**: 277-284.
- Kalafatić M. (1997): Regeneration and asexual reproduction of *Hydra oligactis* treated with different pesticides. Biol Bratislava **52**: 475-480.
- Kalafatić M., Kopjar N. (1994): Response of Green Hydra to the Treatment with Different Pesticides under Laboratory Conditions. Zeitsch. Angew. Zool. **2**: 213-223.
- Kalafatić M., Kopjar N. (1995): Response of green hydra to pirimicarb. Biol Bratislava **50**: 289-292.
- Kalafatić M., Kovačević G., Ljubešić N., Šunjić H. (2001): Effects of ciprofloxacin on green hydra and endosymbiotic alga. Period. Biol. **103**: 267-272.
- Kalafatić M., Žnidarić D., Lui A. (1991): Changes in *Hydra vulgaris* Pallas (Cnidaria) Caused by the Effect of Torak EC 24 Insecticide. Acta hydrochim hydrobiol **19**: 693-701.
- Karntanant W., Pascoe D. (2002): The toxicity of copper, cadmium and zinc to four different Hydra (Cnidaria: Hydrozoa). Chemosphere **47**: 1059-1064.
- Kasahara S. and Bosch T.C.G. (2003): Enhanced antibacterial activity in Hydra polyps lacking nerve cells. Dev Comp Immunol **27**: 79-166.
- Koizumi O. (2002): Developmental neurobiology of hydra, a model animal of Cnidarians. Can J Zool **80**: 1678-1689.
- Kovačević G., Gregorović G., Kalafatić M., Jaklinović I. (2009a): The Effect of Aluminium on the Planarian *Polycelis Felina* (Daly.). Water Air Soil Pollut **196**: 333-344.

- Kovačević G., Kalafatić M., Horvatin K. (2009b): Aluminium Deposition in Hydras. *Folia Biol Krakow* **57**: 139-142.
- Kovačević G., Ljubešić N., Kalafatić M. (2005): Newly described mechanisms in hydra-alga symbiosis. *U: Bosch T.G.C. Bosch, Holstein T.W., David C.N. (ur.) Abstract book of the International Workshop Hydra and the Molecular Logic of Regeneration. Tutzing, DFG, 95.*
- Kovačević G., Želježić D., Horvatin K., Kalafatić M. (2007): Morphological Features and comet assay of green and brown hydra treated with aluminium. *Symbiosis* **44**: 145-152.
- Kuznetsov S., Lyanguzowa M., Bosch T.C.G. (2001): Role of epithelial cells and programmed cell death in Hydra spermatogenesis. *Zoology* **104**: 25-31.
- Levis A.G., Buttignol M., Vettorato L. (1975): Chromium cytotoxic effects on mammalian cells in vitro. *Atti Assoc Gent Ital* **20**: 9.
- Margulis L., Sagan D. (2002): *Acquiring Genomes: A Theory of the Origin of Species*, Basic Books, New York
- Martin H.M., Coughtrey P.J. (1982): *Biological monitoring of heavy metal pollution: Land and air*. Applied Science. London, 475.
- Matoničkin I. (1978): *Beskralješnjaci. Biologija nižih avvertabrata. Školska knjiga, Zagreb*
- McCord J.M. (2000): The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* **108**: 652-659.
- Müller-Parker G., Pardy R.L. (1987): The green hydra symbiosis: analysis of a field population. *Biol Bull* **173**: 367-376.
- Nakahara M., Handa S., Nakano T., Deguchi H. (2003): Culture and pyrenoid structure of a symbiotic *Chlorella* species isolated from *Paramecium bursaria*. *Symbiosis* **34**: 203-214.
- Nevin K.P., Lovley D.R. (2000): Potential for nonenzymatic reduction Fe(III) during microbial oxidation of organic matter coupled to Fe(III) reduction. *Environ Sci Tech* **34**: 2472-2478.

O'Brien TL. (1982): Inhibition of vacuolar membrane fusion by intracellular symbiotic algae in *Hydra viridis* (Florida strain). J Exp Zool **223**: 211-218.

Parr M.B., Ren H.P., Kepple L., Parr E.L., Russel L.D. (1993): Ultrastructure and morphometry of the urethral glands in normal, castrated, and testosterone-treated castrated male mice. Anat Rec **236**: 449-458.

Poli G., Parola M. (1997): Oxidative damage and fibrogenesis. Free Radic Biol Med **22**: 287-305.

Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće, NN br. 46/94.

Pyatt F.B., Dodd N.M. (1986): Some effect of metal ions on the freshwater organisms, *Hydra oligactis* and *Chlorohydra viridissima*. Indian J Exp Biol **24**: 169-173.

Reisser W., Wiessner W. (1984): Autotrophic eukaryotic freshwater. U: Linskens HF, Heslop-Harrison J (ur.) Cellular interactions, Encyclopedia of plant physiology (new series). Berlin, Heidelberg, New York, Springer 59-90.

Stebbing A.R.D. (1982): Hormesis-the stimulation of growth by low levels of inhibitors. Sci Total Environ. **22**: 213-234.

Siebert S., Anton-Erxleben F. and Bosch T.C.G. (2007): Cell type complexity in the basal metazoan *Hydra* is maintained by both stem cell based mechanisms and transdifferentiation. Dev Biol **313**: 13-24

Siebert S., Thomsen S., Reimer M.M., Bosch T.C.G. (2005): Control of foot differentiation in *Hydra*; phylogentic footprinting indicates interaction of head, bud and foot patterning systems. Mech Development (MOD) **122**: 998-1007.

Tornadore N., Marcucci R., Castagna A., Villani M. (2004): A morphological, cariological and morphometrical analysis of *Teucrium euganenum* Vis. And its allies. Plant Biosystems **138**:145-155.

Uredba o opasnim tvarima u vodama, NN br.78/98.

Zacharias H., Anokhin B., Khalturin K. and Bosch T.C.G. (2004) Genome sizes and chromosomes in the basal metazoan Hydra Zoology **107**: 219–227.

Zamarovsky V. (1985): Junaci antičkih mitova. Školska knjiga, Zagreb.

Zhang X., Zhang J., Li L., Sarras MP. Jr (2005): Biogenesis of hydra mesoglea and its functions in regeneratio. U: Bosch TCG, Holstein TW, David CN (ur.) Abstract Book of the Internatonal Worksop Hydra and the Molecular Logic of Regeneratio. Tutzing, DFG, 22.

Žnidarić D. (1970): Comparison of the regeneratio of the hypostome with the budding process in Hydra littoralis. Roux Arch **166**: 45-53.

Žnidarić D. (1971): Regeneration of the foot. I *Hydra littoralis*. Z mikrosk anat Forsch **84**: 503-510.

Žnidarić D., Kalafatić M., Kopjar N. (1995): The survival of *Hydra oligactis* Pallas in unpleasant conditions. Zeitschrift fur Angewandte Zoologie **2**: 157-163.

Žnidarić D., Kalafatić M., Lui A. (1987): Effects of Dimiline Upon Budding Hydra. Z mikrosk anat Forsch **101**: 221-228.